

PAT-NO: JP02000157226A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 2000157226 A

TITLE: ENZYMOLYSIS PRODUCT OF LAYER AND ITS USE

PUBN-DATE: June 13, 2000

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
SUETSUNA, KUNIO	N/A
SAITO, MASANOBU	N/A

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
SHIRAKO:KK	N/A

APPL-NO: JP11226165

APPL-DATE: August 10, 1999

PRIORITY-DATA: 10270906 ( September 25, 1998)

INT-CL (IPC): A23L001/337, A23L001/30 , A61K035/80 , A61K038/00 , A61P009/12  
, C07K014/405

ABSTRACT:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a raw material effective in the fields of medicines, health foods, etc., by using laver as a raw material.

SOLUTION: This laver enzymolysis product comprises a **peptide mixture which is obtained by hydrolyzing laver** with pepsin and has a hypotensive action.

When the laver as the raw material is preliminarily boiled for >1 hr before hydrolyzed with the pepsin, and then subjected to the removal of the soup, the hypotensive action is enhanced, and the bitter taste, smell, viscosity, etc., of the laver enzymolysis product are removed. Thereby, the laver enzymolysis product is more useful as the hypotensive agent. The laver enzymolysis product further has effects contributing to health, such as a hypoglycaemic action, a hypocholesterolemic action, and a calcium precipitation-inhibiting action, and can be added to foods to prepare health foods. When the laver is hydrolyzed with the pepsin and further with an enzyme having a peptidase activity, the product giving a good taste and thereby suitable as a food additive can be

obtained.

COPYRIGHT: (C)2000,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-157226

(P2000-157226A)

(43) 公開日 平成12年6月13日 (2000.6.13)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
A 2 3 L 1/337	1 0 3	A 2 3 L 1/337	1 0 3 A
1/30		1/30	B
A 6 1 K 35/80		A 6 1 K 35/80	Z
38/00		A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 9/12		C 0 7 K 14/405	

審査請求 未請求 請求項の数19 O L (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-226165

(22) 出願日 平成11年8月10日 (1999.8.10)

(31) 優先権主張番号 特願平10-270906

(32) 優先日 平成10年9月25日 (1998.9.25)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 391017986

株式会社白子

東京都江戸川区中葛西7丁目5番9号

(72) 発明者 末綱 邦男

山口県下関市川中本町16-14

(72) 発明者 斉藤 雅信

東京都江戸川区中葛西6-1-17 株式会社白子研究開発センター内

(74) 代理人 100087332

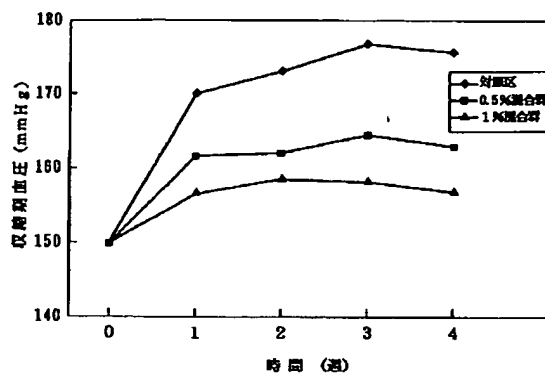
弁理士 猪股 祥晃 (外1名)

(54) 【発明の名称】 海苔の酵素分解物およびその用途

(57) 【要約】

【課題】 海苔を原料として医薬分野および健康食品分野等に有効な素材を提供する。

【解決手段】 海苔をペプシン分解して得られる血圧降下作用を有するペプチド混合物からなる海苔の酵素分解物であって、ペプシン分解前にあらかじめ原料である海苔を1時間以上煮沸処理した後、煮汁を除去したことによって、血圧降下作用がさらに高まり、かつ苦みや臭み、粘性等が除去される。したがって、この酵素分解物は血圧降下剤としてより有用となる。また血圧降下以外にも健康に寄与する効果、例えば血糖値低下、コレステロール値低下、カルシウム沈殿阻止作用等があり、食品に添加して健康食品とすることができる。ペプシン分解した後さらにペプチダーゼ活性を有する酵素で分解することによって、さらに呈味性のよいものとなり、食品添加物としてより好適なものを得ることができる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 原料となる海苔を1時間以上煮沸処理した後、煮汁を除去し、次に水およびペプシンを加えてペプシン分解することによって得られたペプチド混合物を含むことを特徴とする海苔の酵素分解物。

【請求項2】 請求項1記載の海苔の酵素分解物を有効成分とすることを特徴とする血圧降下剤。

【請求項3】 請求項1記載の海苔の酵素分解物を食品に添加してなる健康食品。

【請求項4】 カルシウム沈殿阻止効果を有する請求項3記載の健康食品。

【請求項5】 抗変異原活性を有する請求項3記載の健康食品。

【請求項6】 血漿コレステロール低下効果を有する請求項3記載の健康食品。

【請求項7】 脳卒中予防効果を有する請求項3記載の健康食品。

【請求項8】 肝臓コレステロール低下効果を有する請求項3記載の健康食品。

【請求項9】 肝機能改善効果を有する請求項3記載の健康食品。

【請求項10】 SOD様活性を有する請求項3記載の健康食品。

【請求項11】 抗酸化効果を有する請求項3記載の健康食品。

【請求項12】 血糖値低下効果を有する請求項3記載の健康食品。

【請求項13】 請求項1記載の海苔の酵素分解物を食品に添加してなる減塩食品。

【請求項14】 原料となる海苔を1時間以上煮沸処理した後、煮汁を除去し、次に水およびペプシンを加えてペプシン分解し、さらにペプチダーゼ活性を有する酵素で分解することによって得られるペプチド混合物を含むことを特徴とする海苔の酵素分解物。

【請求項15】 遊離アミノ酸量が10%以上である請求項14記載の海苔の酵素分解物。

【請求項16】 請求項14記載の海苔の酵素分解物を有効成分とすることを特徴とする血圧降下剤。

【請求項17】 請求項14記載の海苔の酵素分解物を食品に添加してなる健康食品。

【請求項18】 請求項14記載の海苔の酵素分解物を主成分とすることを特徴とする調味料。

【請求項19】 請求項14記載の海苔の酵素分解物を食品に添加してなる減塩食品。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は種々の有効な薬理作用を有する新規な海苔の酵素分解物およびその用途に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 従来海苔は専ら食用として供されてきたが、本発明者らは海苔の機能や成分に着目し、これを他の分野にも利用すべく、海苔の分解物について種々研究を行ってきた。例えば、血圧降下作用をはじめとする種々の有効な機能を有する物質として、ペプチド混合物を海苔のペプシン分解により得て、これを先に出願した（特開平10-175997号）。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 上記のペプチド混合物は血圧降下剤として医薬に用いたり、あるいはカルシウム沈殿阻止作用、抗変異原活性、血漿及び肝臓コレステロール低下作用、血糖値低下作用、肝機能改善作用、抗酸化作用、SOD様活性を有する健康食品に用いたりすることができるが、特に医薬品として用いる場合、その作用を高めるためには酵素分解物をさらに精製する必要がある。また、医薬品ほど厳格な生理活性を必要としない食品として用いる場合にも、酵素分解物中には多糖類が残存しているため、水系の溶媒に溶解させると粘度の高い溶液となるので、ある程度精製したものでないと、用途が限られるという問題があった。さらに、酵素分解物が苦みや異味をもつことも、その用途が限られる原因となった。

【0004】 本発明は、海苔ペプチド混合物の上記問題点を解消し、医薬品、食品等、幅広い利用面において更に使用しやすいように改良した海苔の酵素分解物を提供することを目的とする。

## 【0005】

【発明を解決するための手段】 すなわち、本発明は、

(A) 原料となる海苔を1時間以上煮沸処理した後、煮汁を除去し、次に水およびペプシンを加えてペプシン分解することによって得られたペプチド混合物を含むことを特徴とする海苔の酵素分解物に関し、さらに(B) 上記においてペプシン分解した後さらにペプチダーゼ活性を有する酵素で分解することによって得られたペプチド混合物を含むことを特徴とする海苔の酵素分解物に関する。

【0006】 さらに本発明は上記(A)および(B)各海苔の酵素分解物の用途に関するものであって、これらの酵素分解物を有効成分とする血圧降下剤、これらの酵素分解物を食品に添加してなる健康食品、減塩食品に関する。また、後者すなわち(B)の酵素分解物を主成分とする調味料に関する。

【0007】 本発明の海苔の酵素分解物を製造するには、上記したように原料海苔を1時間以上煮沸してその煮汁を除去した後、酵素分解を行うが、これはペプチドの原料となる蛋白質以外の成分を除去してペプシンによる酵素分解率を高め、血圧降下作用、カルシウム沈殿阻止作用、抗変異原性、血漿コレステロール低下作用、脳卒中予防効果、肝臓コレステロール低下効果、肝機能改善効果、SOD様活性、抗酸化効果、血糖値低下作用を

有するペプチドの生成を促すためである。前述した先の発明では、酵素分解前にこのような煮沸処理と煮汁除去処理をしなかったため、酵素分解物の中に目的とするペプチド以外の成分が多く含まれ、また酵素分解率そのものも低く、その結果血圧降下作用も本発明に比べて十分とはいえなかった。

【0008】本発明では煮沸処理および煮汁除去処理をするため、血圧降下能を例にとればその指標となるアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害活性が3〜5倍以上強まることが確認された。なお、ペプチドの原料となる海苔に含まれる水溶性蛋白質が煮汁に溶出しないう瞬時に蛋白質を加熱凝固させるために、煮沸処理は熱湯から開始することが必要である。

【0009】本発明の海苔の酵素分解物は、上記したようにアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害活性を例にとるとその活性が高いので、先に発明した前記海苔ペプチド混合物と比較して、未精製物でも前記ペプチド混合物の精製物と同等の血圧降下作用を示し、高い活性を必要とする医薬品への適用がより容易になった。一方、食品分野への利用については、このように煮沸処理した後煮汁を除去することによって、海苔特有の生臭みを除去することができるので、食品に添加した場合に食品の香味に悪影響を及ぼすことがない。したがって食品の香味に影響を与えずに各種の機能を付与することができるので、健康食品としてより好ましいものを提供することができる。

【0010】さらに上記のペプチン分解の後に、ペプチダーゼ活性を有する酵素により二次分解反応を行って遊離アミノ酸含量を10%以上に増加させることができ、これらより血圧降下作用を維持しつつ呈味性が付与された海苔の酵素分解物を得ることができる。したがって、呈味性を付与し、蛋白質の酵素分解物特有の苦みを低減したものを調製する必要がある時には、ペプチダーゼ活性を有する酵素により二次分解反応を実施するとよい。二次分解に用いるペプチダーゼ活性を有する酵素としては、アンジオテンシンⅠ変換酵素阻害など諸活性を維持しつつ遊離アミノ酸量を増やす作用を示すものが好ましく、例えばフレーバーザイム、スミチームを挙げることができる。

【0011】本発明の海苔の酵素分解物は、煮沸後の煮汁除去処理によりペプチド以外の夾雑物の大半が除去されているが、加水分解中には活性の中心となるペプチド以外に、他のペプチドやペプチド以外の成分も存在している。したがって、本発明の酵素分解物を精製して用いた場合には、さらに高活性の血圧降下などの諸作用をもつものが得られる。勿論、加水分解後の混合物のままでも各種の用途に用いてもよい。精製する場合には、限外濾過、吸着剤処理、その他適宜の方法でペプチド以外の成分を除去する方法が採用される。

【0012】また、さらに必要があれば、本発明の酵素分解物を単独で、もしくは澱粉、デキストリン等の賦形剤や他の食品素材あるいは食品添加物とともに、スプレードライ、凍結乾燥等適宜の方法により乾燥してもよい。

【0013】上記したように本発明の海苔の酵素分解物は血圧降下作用を示し、血圧降下剤として使用することができる。また、カルシウム沈殿阻止作用、Trp-P-1、AF-2等の変異原に対する抗変異原活性、血漿および肝臓コレステロール低下作用、脳卒中予防効果、肝機能改善効果、SOD様活性効果、抗酸化効果、血糖値低下効果を有するので、本発明の海苔の酵素分解物を食品に添加することによって、これらの作用に基づく健康食品とすることができる。

【0014】さらに、本発明の海苔の酵素分解物は塩味を引き立たせる効果を有していることが分かったので、これを添加することにより減塩タイプの食品とすることができる。

【0015】

【発明の実施の形態】以下、実施例によって本発明をさらに詳細に説明する。

(実施例1)

(1) 海苔の酵素分解物の調製

乾海苔を高速粉砕器にて35meshに微粉化したもの50kgを、95℃に加温した熱湯950lに加え、これを1時間煮沸した後、煮汁を除去した。次に50℃の水950lを加え、HClにてpHを2.0に調整し、ペプチン(天野製薬製)2kgを加え、攪拌下50℃で24時間反応させた。反応により得られた分解液をNaOHの1N溶液にてpHを5.0に調整し、50℃に10分間保持してペプチンを失活させ、14000rpmで20分間遠心分離し、上清をガラスフィルターにて濾過した。その後、濾過助剤として珪藻土を添加してフィルタープレス機にて再度濾過した後、減圧濃縮し、直ちにスプレードライして乾燥海苔の酵素分解物を得た。

【0016】比較試験として、同一原料を用い、煮沸処理を行わないこと以外は全く同様に処理したものと、煮沸処理したが煮沸処理後の煮汁を廃棄しないこと以外は全く同様に処理したものの2種類の酵素分解物を調製した。

【0017】これらの3種の酵素分解物について、回転粘度計により10%水溶液の粘度を測定し、分光光度計により0.2%水溶液の吸光度を測定し、さらに一般成分の分析を行い、これらの測定値を表1に示した。また、得られた各酵素分解物の組成(%)も表1に示した。

【0018】

【表1】

工程	乾海苔→煮沸処理 →煮汁除去→酵素反応	乾海苔→煮沸処理 →酵素反応	乾海苔→酵素反応
粘度 (mPa・sec)	20	120	60
吸光度 (370nm)	0.45	0.75	0.77
収率 (%)	53.6	95.2	94.1
水分 (%)	2.5	2.9	2.8
蛋白質 (%)	72.5	40.5	51.9
脂質 (%)	0.2	0.1	0.1
糖質 (%)	9.8	12.1	13.4
繊維 (%)	7.5	30.1	25.2
灰分 (%)	7.5	14.3	9.4

【0019】(2) 二次酵素分解による酵素分解物の調製  
 上記(1)で得られた海苔の酵素分解物1kgを50lの水に溶解した後、ペプチダーゼ活性を有する酵素として、フレーバーザイム(ノボノルディスクバイオインダストリー社製)を10g添加し、50℃にて6時間酵素分解を行った後、これを80℃にて10分間保持して酵素を失活させた。その後、濾過助剤として珪藻土および活性炭を添加して濾過し、次に減圧濃縮した後、直ちに 30  
 スプレードライして、海苔の酵素分解物を得た。 \*

\*【0020】この海苔酵素分解物と、上記(1)で得た海苔酵素分解物について、遊離アミノ酸量を測定すると同時に、10人のパネラーにより10段階評価の官能評価試験を行った。最も良いと評価されるものを10点とした。遊離アミノ酸量と10人の官能評価試験の結果の平均値を表2に示す。

【0021】

【表2】

工程	A 乾海苔→煮沸処理 →煮汁除去→酵素反応 →二次酵素反応	B 乾海苔→煮沸処理 →煮汁除去→酵素反応	C 乾海苔→酵素反応
全蛋白質に占める遊離アミノ酸の割合(%)	10.1	1.1	0.2
旨味	9	5	5
甘み	10	5	4
塩味	5	5	6
香り	9	7	2

【0022】表2に示すように、香りの評価値がCの場合は2であるのに対し、Bでは7、Aでは9となり、本発明の製造方法によって得られる海苔の酵素分解物は、煮沸処理をし煮汁を除去したことによって、海苔の生臭みが低減したことがわかる。また、二次酵素反応を行ったAは遊離アミノ酸の割合が増加し、官能的評価として旨味と甘味が高く評価された。

#### 【0023】(3) 酵素分解物の精製

上記(1)で得られた海苔の酵素分解物0.5kgを蒸留水に溶解し、HClで置換したバイオラッド社製Dowex-50(H+)カラム(φ20cm×108cm)にこれを負荷し、20lの蒸留水で洗浄後、2Nアンモニア水にて吸着しているペプチドを溶出した。この溶出液からエバポレーターにてアンモニアを除去した後、凍結乾燥して蛋白質含量99%の精製海苔酵素分解物を360.7g得た。

#### 【0024】(試験例)

(試験例1) アンジオテンシンI変換酵素阻害活性の測定

所定濃度に溶解した実施例1(1)および(2)の海苔の酵素分解物を試験管にそれぞれ50μl入れた。次いで酵素基質としてL-ヒパリルヒスチジルロイシン(ペプチド研究所製)を、1.0M塩化ナトリウムを含むホウ酸\*

\*緩衝液(pH=8.3)に溶解して、12.5mMの濃度とし、これを上記試験管に100μl添加し、最後に蒸留水に溶かして25mU/mlにした。市販アンジオテンシンI変換酵素溶液を100μl加えて、37℃にて1時間反応させた。その後、HClの0.5N溶液250μlを加えて反応を停止し、5分間放置後、酢酸エチル1.5mlを管壁に伝わらせながら加え、激しく攪拌後、遠心分離(3000rpm, 10分)を行い、上層(酢酸エチル層)0.5mlを採取した。これを乾燥器に入れて120℃、30分間で酢酸エチルを蒸発させた後、生成した馬尿酸を1.0M塩化ナトリウム3mlにて溶解し、228nmにて吸光度を測定した。

【0025】上記各サンプルでの吸光度をEsとし、サンプルの代わりに蒸留水を加えた時の吸光度値をEcとし、予め反応停止液を加えて反応させた時の吸光度値をEbとして、阻害率を阻害率(%) =  $\{(Ec - Es) / (Ec - Eb)\} \times 100$ で表した。アンジオテンシンI変換酵素阻害活性IC<sub>50</sub>値は、アンジオテンシンI変換酵素を50%阻害するために必要なサンプル濃度である。結果を表3に示した。

#### 【0026】

##### 【表3】

工程	ペプチド混合物当たりの アンジオテンシンⅠ変換酵素阻害 活性 IC <sub>50</sub> (mg/ml)	蛋白質当たりの アンジオテンシンⅠ変換酵素阻害 活性 IC <sub>50</sub> (mg/ml)
乾海苔→酵素反応	1.52	0.53
乾海苔→煮沸処理 →酵素反応	1.72	0.49
乾海苔→煮沸処理 →煮汁除去→酵素反応	0.32	0.21
乾海苔→煮沸処理 →煮汁除去→酵素反応 →二次酵素反応	1.85	0.42

【0027】表3に示すように、乾海苔を煮沸処理し煮汁を除去してペプシンによる分解率を高めた本製造方法による海苔の酵素分解物は、ペプチドの生成量が増加しているものと考えられ、アンジオテンシンⅠ変換酵素の阻害活性も強い。一方旨味性を付与するために二次酵素反応を行った酵素分解物では、阻害活性は弱くなったが従来技術である乾海苔→酵素反応と同程度の阻害活性であった。

【0028】(試験例2)ラットへ投与した時の降圧効果

日本エスエルシー(株)より15週齢雄性高血圧自然発症ラット(SHR)を購入し、2週間の予備飼育後、収\*30

20 \*縮期血圧が190mmHg以上のラット6匹を1群として用い、実施例1(1)のペプチド混合物(煮沸処理を行ったもの)および煮沸処理を行わなかった比較試験サンプルを30mg経口投与した。血圧は非観血的尾動脈血圧測定装置(室町機械製、MK-1030型)を用い、tail-cuff法により、投与前、投与後1時間、2時間、4時間、6時間、8時間のSHR尾動脈の収縮期血圧の測定を測定時間毎に5回行い、得られた測定値の最高値と最低値を棄却し、3回の平均値をもって各時間の測定値とした。結果を表4に示す。

【0029】

【表4】

	pre	1hr	2hr	4hr	6hr	8hr
実施例1 (1)	204.3 ± 10.2	193.7 ± 29.3	190.1 ± 18.5	182.5 ± 12.2	186.2 ± 22.1	187.9 ± 15.2
乾海苔 →酵素分解	202.2 ± 8.7	193.7 ± 28.2	192.1 ± 27.4	191.7 ± 12.5	189.6 ± 13.5	194.8 ± 18.4

【0030】表4に示すように、本発明の実施例1の(1)で製造した酵素分解物は、乾海苔→酵素分解の方法で製造した酵素分解物よりも、降圧効果が強いことがわかった。

(試験例3)ラットへ長期投与した時の高血圧および脳卒中発症予防効果

日本チャールズリバー社より5週齢雄性脳卒中易発症性高血圧自然発症ラットを購入し、1週間の予備飼育後、7匹1群として用い、市販粉末飼料群、市販粉末飼料に実施例1(1)の酵素分解物を0.5%混合した飼料 ※

40 ※群、および市販粉末飼料に実施例1(1)の酵素分解物を1%混合した飼料群の3群を設け、飼料および飲料水(1%食塩水溶液)を自由摂取させて2ヶ月間の混餌投与試験を実施した。血圧は試験開始から1週間ごとに非観血的に測定し、さらに1日1回、一般症状、神経症状の有無および生死の有無を観察した。結果を図1および表5に示す。

【0031】

【表5】



11

12

	脳卒中発症率 (%)	平均生存日数 (日)
対照区	100	34
0.5%混餌区	57	39
1%混餌区	29	51

【0032】表5に示すように、本発明の海苔の酵素分解物の飼料への混合濃度が高くなるにしたがって、脳卒中の発生率は低下し、ラットの生存日数が延びていることが確認された。また、図1に示されるように、収縮期血圧は対照区に比べて0.5%混合群ではかなり低下しており、1%混合群ではそれよりさらに低下して、本発明の海苔の酵素分解物が高血圧症予防効果を有することが確認された。

【0033】(試験例4)カルシウム沈殿阻止能の測定  
カルシウムの吸収促進メカニズムの一つであるカルシウム沈殿阻止能を、リン酸緩衝液中における酵素分解物共存下での塩化カルシウムの沈殿阻止能により判定した。すなわち、サンプルとして、蒸留水に溶解して所定の濃度とした実施例1(3)の精製酵素分解物3mlと20mM塩化カルシウム溶液1mlを混和後、5mMリン酸緩衝液(PH=7.0)4mlを加え、37℃で2時間放置し、遠心分離後(3000×g、10分)の上清中に溶解しているカルシウムを測定した。尚、比較のためにカゼインホスホペプチドを用いて同様の実験を行った。

【0034】カゼインホスホペプチドはカルシウム沈殿阻止機能があり、カルシウム吸収を助ける食品素材として広く用いられているものである。結果を図2に示す。

【0035】なお図2では、横軸に蒸留水中のサンプル濃度(mg/ml)をとり、縦軸に測定したカルシウム濃度(ppm)をとった。図2に示されるように、本発明の精製酵素分解物では濃度依存的にカルシウム沈殿形成阻止効果が高くなっており、カゼインホスホペプチドとほぼ同等であることが確認された。

【0036】(試験例5)抗変異原活性の測定  
体内に取り込まれた発癌物質を無毒化する効果の一つである抗変異原活性についてumu-testを用いて行った。umu-testとは、Salmonella typhimurium菌の突然変異に関\*

10\*与しているumu遺伝子の発現をβ-ガラクトシダーゼ活性を指標として測定する変異原性試験の一つである。変異原物質であるTrp-P-1、AF-2およびIQをそれぞれSalmonella typhimurium菌に加えて突然変異を起こさせた時のβ-ガラクトシダーゼ活性を基質X-galの発色によって測定し、これを変異原性100とする。これを基準値として、実施例1(2)の酵素分解物(二次酵素分解したもの)を所定濃度添加したものについて同様にβ-ガラクトシダーゼ活性を測定し、基質X-galの発色を度合いを上記基準値と比較した。結果を図3に示す。

【0037】図3に示されるように、実施例1(2)の酵素分解物の添加濃度が高くなるにしたがって、変異原物質のいずれに対しても変異原性は低下しており、この酵素分解物が抗変異原活性を有していることが確認された。

【0038】(試験例6)ラットへ投与した時の血漿コレステロール濃度低下作用  
実験動物として4週齢の雄性Wistar系STラットを市販固形飼料で1週間予備飼育し、5匹1群として3週間の飼育実験を行った。試験飼料は、実施例1(1)の酵素分解物をMF粉末飼料(オリエンタル酵母工業製)に1%(粗蛋白質量として0.7%)配合したものとし、対照区の飼料はMF粉末飼料のみとした。飼料は毎日交換し、飲料水とともに自由摂取させた。動物飼育室は室温25℃、湿度50±5%に保ち、12時間ごとの明暗サイクル(午前8時点灯、午後8時消灯)に調整した。試験終了後、ラットを断頭して血液を採取後、直ちに血漿脂質成分(総コレステロール、遊離コレステロール、トリグリセリド、リン脂質)の定量を行った。それぞれの測定値を表6に示す。

【0039】

【表6】

13

14

	対 照 区	試 験 区
総コレステロール (mg/dl)	190±6	122±5
遊離コレステロール (mg/dl)	40.8±1.7	21.2±1.3
トリグリセリド (mg/dl)	63.2±2.2	31.4±1.4
リン脂質 (mg/dl)	177±6	159±3

【0040】表6に示すように、本発明の酵素分解物を投与したことにより、血清中の総コレステロール、遊離コレステロール、トリグリセリドおよびリン脂質が低下し、脂質代謝改善効果が確認された。

【0041】(試験例7) マウスへ投与した時の血漿、肝臓中の脂質成分濃度低下作用  
実験動物として4週齢の雄性ICR系マウスを市販固形飼料で1週間予備飼育した後、7匹一群として実験した。試験飼料は0.5%コレステロールおよび1%コール酸を混入したMF粉末飼料中に実施例1(1)の酵素分解物を0.3%配合したものおよび1%配合したものとし、対照区の飼料は0.5%コレステロール、1%コール酸混入MF粉末飼料のみとした。動物飼育室は室温22±4℃、湿度55±15%に保ち、12時間ごとの\*

\*明暗サイクル(午前7時点灯、午後8時消灯)に調整した。28日間の試験終了後、エーテル麻酔下に腹部大静脈により採血し、血漿脂質成分(総コレステロール、HDLコレステロール、トリグリセリド)の定量を行った。

【0042】また肝臓コレステロールの実験は、上記マウスの採血後、肝臓を摘出して秤量し、生理食塩水にて灌流してホモジネート液を作製後、総コレステロール、トリグリセリドを測定した。LDLは総コレステロール値からHDLコレステロール値を減じて求めた。結果を表7および表8に示す。

【0043】

【表7】

	血 漿			
	総コレステロール	トリグリセリド	HDL	LDL
対照群	215.4±1.6	71.2±5.2	77.0±4.2	138.7±3.9
0.3%配合	145.3±3.0	50.0±4.8	71.1±6.8	74.2±5.4
1.0%配合	152.5±3.3	49.0±4.5	91.6±5.5	60.9±5.4

(mg/dl)

【0044】

※ ※【表8】

	肝 臓	
	総コレステロール	トリグリセリド
対照群	6.8±0.2	5.4±0.6
0.3%配合	7.0±0.5	2.9±0.3
1.0%配合	7.7±0.2	3.6±0.2

(mg/g肝臓)

【0045】表7および表8に示すように、対照群と比較して、酵素分解物を配合した群は、血漿の総コレステロール、トリグリセリド、LDL、肝臓のトリグリセリドの低下が認められた。

【0046】(試験例8) 肝機能の改善効果  
実験動物として6週齢の雄性ウエスター系ラットを市販粉末飼料で1週間予備飼育し、7匹一群として試験に供★50

★した。予備飼育後、標準飼料(市販粉末飼料)、試験飼料I(標準飼料に実施例1(1)の酵素分解物を1%混入)、試験飼料II(標準飼料に前記酵素分解物を3%混入)にて14日間飼育した。動物飼育室は室温22±4℃、湿度55±15%に保ち、12時間ごとの明暗サイクル(午前7時点灯、午後8時消灯)に調整した。次に1N水酸化ナトリウム溶液でpH7.2に調整したD-

ガラクトサミン塩酸塩 (Sigma社) 溶液 (300mg/ml) を滅菌フィルターで滅菌し、14日目にラットに800mg/kg体重の割合で腹腔内注射した。なお、投与の前後各4時間ずつ絶食させた。D-ガラクトサミン投与から20時間投与後にネブタール麻酔下で開腹し、心臓より採血し、血漿を分離後、トランスアミナーゼ活性を測定した。

【0047】結果を図4および図5に示す。これらの図に示されるように、対照群と比較して、本発明の酵素分解物を配合した群は、濃度依存的にガラクトサミン肝障害による血漿トランスアミナーゼ (GOT、GPT) 活性の上昇を抑制した。

【0048】(試験例9) スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 様活性の測定

実施例1(1)の酵素分解物をクロマトレックス-OD SDM1020T (C18) に負荷し、順にエタノール濃度0% (画分I)、10% (画分II)、20% (画分III)、50% (画分IV) の各水溶液で溶出し、4画分に分画した。それぞれの画分について以下の方法にてSOD様活性を測定した。2.5mlの50mM炭酸ナトリウム緩衝液 (pH0.2) が入った試験管に、3mMキサンチン、3mMEDTA、1mMXTT (3'-1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium)-bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulfonic acid hydrate)、およびそれぞれの画分の2%水溶液をそれぞれ0.1ml加え、直ちに57ml/ml XOD (キサンチンオキシダーゼ) を0.1ml加えた。25℃で正確に20分間反応させた後、470nmにおける吸光度を測定した。なお、酵素分解物によるXTT還元性への直接的関与によって生ずる誤差を補正するために、キサンチンを添加しないものの吸光度も測定した。

【0049】阻害率は試料を添加しないときの吸光度をコントロールとし、以下の式で求めた。

阻害率 (%) =  $\frac{\text{コントロール} - (\text{キサンチン} (+) - \text{キサンチン} (-))}{\text{コントロール}} \times 100$

O<sub>2</sub><sup>-</sup> によるXTTの還元を50%阻害する濃度を1単位と定めた。結果を表9に示す。

【0050】

【表9】

試験溶液	単位/g
画分I	1000
画分II	5000
画分III	20000
画分IV	50000

【0051】上表に示すように画分III、IVに強いSOD様活性が認められた。

(試験例10) 抗酸化作用の測定

実施例1(1)の酵素分解物をクロマトレックス-OD

SDM1020T (C18) に負荷し、順にエタノール濃度0% (画分I)、10% (画分II)、20% (画分III)、50% (画分IV) 水溶液で溶出し、4画分に分画した。それぞれの画分について以下の方法にて抗酸化活性を測定した。

【0052】反応液としてリノール酸51.5mg、エタノール4.052ml、0.05Mリン酸緩衝液 (pH7.0) 4.0mlおよび脱イオン水1.948mlからなる混合液を用い、この混合液に画分した酵素分解物をそれぞれ10mg添加した。この溶液をネジ付き試験管で密封し、50℃の恒温器中に放置し、48時間毎にリノール酸の過酸化価をロダン鉄法で測定した。すなわち反応液0.1ml、75%エタノール液9.7ml、30%ロダンアンモニア液0.1ml、0.02M塩化第二鉄を含む3.5%塩酸塩溶液0.1mlを添加し、3分間反応させた後、吸光度500nmを測定した。その際、500nmの吸光値が0.35に達するまでの日数を誘導期間 (日) とした。その結果、抗酸化作用を示唆する誘導日数は、 $\alpha$ -トコフェノール3mgの8日に対して、画分Iは7日、画分IIは10日、画分IIIは13日、画分IVは15日であり、抗酸化作用が確認された。

【0053】(試験例11) 血糖値の低下能

出生後2日目の雄性ウイスター系ラットに0.1Mクエン酸緩衝液 (pH4.5) に溶かしたストレプトゾトシン (STZ、Sigma社) 80mg/kgを皮下注射し、STZラットを作製した。その後、母乳で4週間、市販固形飼料で4週間飼育した。空腹時の血糖値に基づき、一群7匹に群分けし、それぞれ実験食として対照群には標準飼料 (市販固形飼料)、試験群には試験飼料I (標準飼料に実施例1(1)の酵素分解物を1%混入)、試験飼料II (標準飼料に前記酵素分解物を3%混入) にて8週間飼育した。動物飼育室は室温22±2℃、湿度55±10%に保ち、12時間ごとの明暗サイクル (午前7時点灯、午後8時消灯) に調整した。実験開始後、2週間間隔にて、5時間絶食後に尾静脈から採血し血漿中のグルコース濃度を測定した。結果を図6に示す。図6に示されるように、対照群と比較して、本発明の酵素分解物を配合した群は、濃度依存的に血漿中のグルコース濃度を低下させた。

【0054】(実施例2) 実施例1(1)で調製した海苔の酵素分解物を5重量%になるように、鶏卵にて溶かして溶き卵を50g調製し、これを、食塩6g、醤油3g、グラニュー糖3g、風味調味料 (かつお、椎茸、昆布) 2g、水150gにて調製したスープストックと合わせ、それぞれ50gずつトレイに充填し、凍結乾燥を行い、即席たまごスープを作製した。

【0055】(実施例3) 実施例1(1)で調製した海苔の酵素分解物8重量%、40%減塩醤油45重量%、EDM10重量%、カツオエキス5重量%、酵母エキス2重量%、唐辛子エキス0.01重量%および水30重量

17

%を加熱混合して味付け海苔の味液を調製した。これを焼海苔に両面1ml塗布して乾燥させて味付け海苔を作製した。これはグルタミン酸ソーダ無添加の当社従来品と比較して30%減塩の味付け海苔となった。

【0056】(実施例4) 実施例1(2)で調製した海苔の酵素分解物2重量%、40%減塩醤油17重量%、味醂17重量%、カツオだし34重量%、砂糖2重量%および水28重量%を加熱混合し、減塩めんつゆを作製した。

【0057】(実施例5) 実施例1(1)で調製した海苔の酵素分解物80重量%および乳糖20重量%を混合し、これを打錠機にて打錠して、血圧降下作用を有する錠剤を作製した。

【0058】(実施例6) 実施例1(2)で調製した海苔の酵素分解物1重量%、可溶性大豆蛋白質9重量%、砂糖15重量%、濃縮レモン果汁1重量%、増粘多糖類0.2重量%、ヨーグルトフレーバ0.1重量%および水73.7重量%を混合し、これをボトルングした後殺菌して、プロテインスコアが98であるプロテイン飲料を作製した。

【0059】(実施例7) 実施例1(3)で調製した精製海苔酵素分解物5g、塩化ナトリウム9g、クロロブタノール5gおよび炭酸水素ナトリウム1gを蒸留水1000mlに溶解し、これを2本の点滴ビンに分注し、抗高血圧用輸液を作製した。

【0060】

【発明の効果】以上説明したように、本発明によれば、

18

海苔をペプシン分解前に予め煮沸処理および煮汁除去処理したことにより、高い血圧降下作用、カルシウム沈殿阻止作用、抗酸化作用、SOD様活性、血漿・肝コレステロール低下作用、血糖値低下作用、肝機能改善作用がある酵素分解物が得られ、副作用のない有用な素材を提供することができる。また、この酵素分解物はペプシン分解前に予め煮沸処理および煮汁除去処理したことにより、苦みや臭みが除去され、かつ粘度が低くなるので、健康食品の成分としてもより有用なものとなる。特にこれをさらにペプチダーゼ活性を有する酵素で二次分解した場合には、呈味性も優れたものとなる。したがって、健康食品成分として以外に、調味料としても用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の海苔の酵素分解物のラットへの長期投与による血圧測定試験の結果を示す図。

【図2】本発明の海苔の酵素分解物のカルシウム沈殿阻止能試験の結果を示す図。

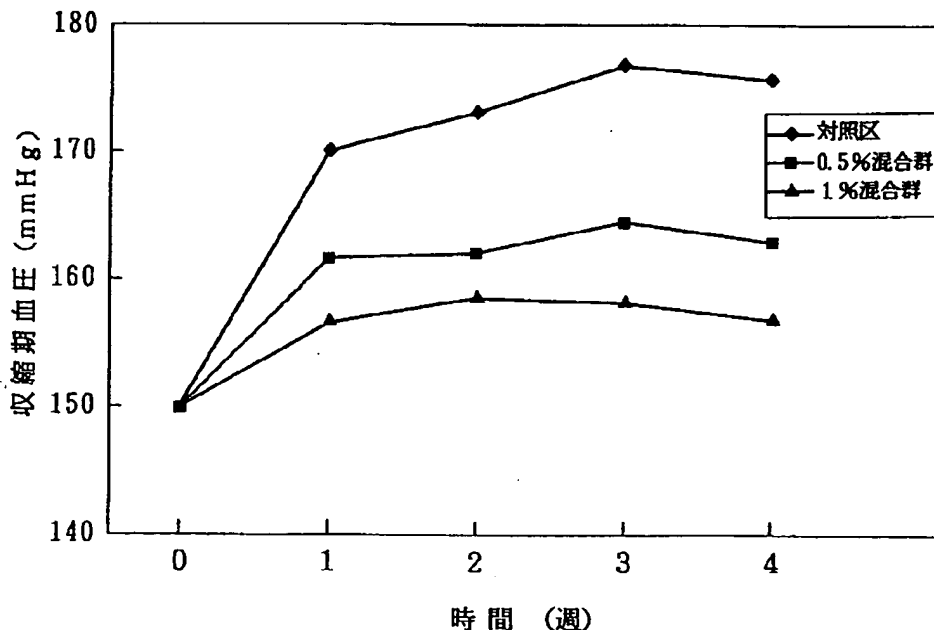
【図3】本発明の海苔の酵素分解物の抗変異原活性測定試験の結果を示す図。

【図4】本発明の海苔の酵素分解物の血漿トランスアミナーゼ活性(GOT)抑制効果を示す図。

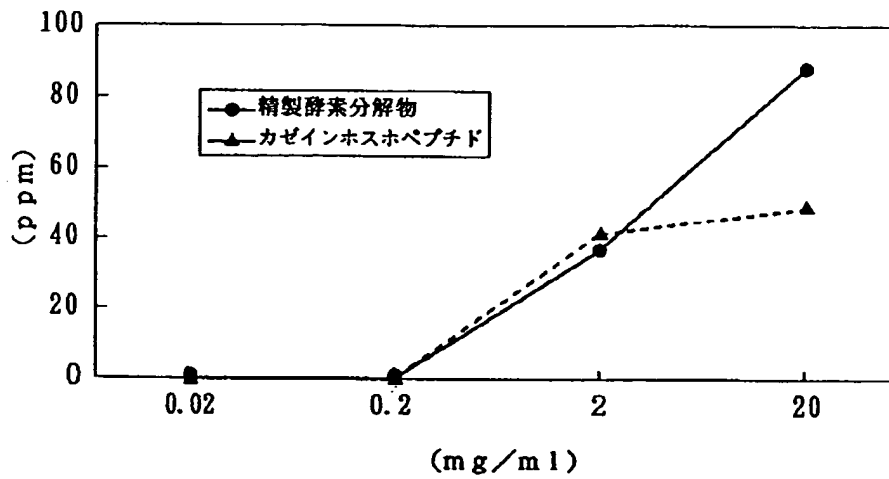
【図5】本発明の海苔の酵素分解物の血漿トランスアミナーゼ活性(GPT)抑制効果を示す図。

【図6】本発明の海苔の酵素分解物の血糖値低下効果を示す図。

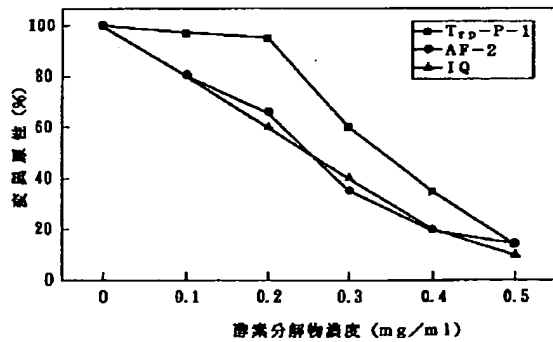
【図1】



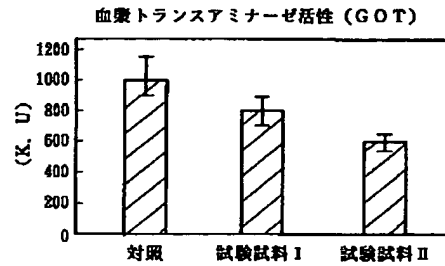
【図2】



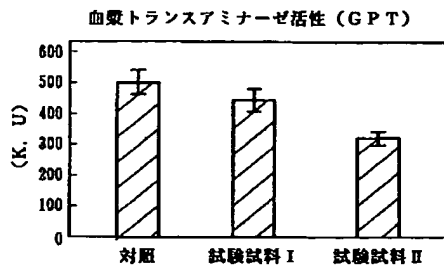
【図3】



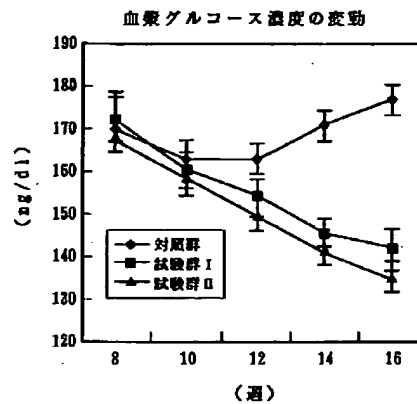
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>  
)

識別記号

F I

ターマコード(参考

C 0 7 K 14/405

A 6 1 K 37/18